

キタムラサキウニ胚および マガキ胚の培養手順

武田 尚也

1. はじめに

キタムラサキウニおよびマガキの発生を、毒性試験という形で観察する機会を得た。毒性試験についての論文は、培養手順の詳細は省略されており、また、正常な発生を観察するための一般的な培養手順とは異なる特殊な条件下である。すなわち、通常の発生観察ではそれなりに大容量の水槽を用い、エアレーションや換水をすることができ、多くの操作は定性的でも問題ない。一方で、毒性試験では厳密に濃度調整をした試験区を多数用意するために、多数の小型容器を用いることとなり、エアレーションや換水ができず、すべての操作が定量的でなければならない。よって、発生観察の手法をそのまま用いることはできない。このため、当該実験に最も適合する作業手順書がなく、相応しい培養手法を考えながらの作業が求められた。本稿では、試験中の試行錯誤の経験に基づき、あまり記述されることのない培養手順の詳細について紹介する。

2. 材料

キタムラサキウニ (*Strongylocentrotus nudus*)

マガキ (*Crassostrea gigas*)

共に宮城県産 (8月下旬～9月中旬)。キタムラサキウニは野生個体を採集または購入、マガキは養殖個体を購入し、当日使用または数日生簀で蓄養してから使用。

3. 手順

3. 1 キタムラサキウニ

(1) 成体の運搬および保管

採集または購入したキタムラサキウニ成体を持ち運ぶ際は、蓋付きバケツに新聞を敷き、海水を入れずに

キタムラサキウニを入れ、新聞で覆い、保冷剤を置いて蓋をする。再度海水に戻すとその刺激により放卵、放精が起こってしまうことがあるので、すぐに採卵、採精をしない場合も極力生簀で蓄養はせず、水を切った状態で冷蔵保管した方がよい。

(2) KCl水溶液を用いた採卵、採精

キタムラサキウニの雌雄は外見では判別が難しいので、KCl水溶液を用いて放卵、放精させ、成熟度と雌雄を判断する。キタムラサキウニが丁度乗るサイズのビーカー (100 ml等) 5個程度を用意して海水を満たし、状態が良さそうなキタムラサキウニをビーカーと同数選び、口器を上にしてビーカーに乗せる。0.5 M KCl水溶液を口器付近に1 ml程度滴下して卵あるいは精子の放出を誘導する。放出は滴下後数分以内に起こるので、少し待って放出しなければすぐ別の個体を試すようにすると効率がよい。なお、滴下後しばらく待って放出しなかった個体でも、海水に戻すと放出する場合もあるので、確認を終えた個体の様子も時々チェックするとよい。卵、精子ともに、状態が悪ければこの段階から実験をやり直すことになるため、複数個体から採取できれば安全である。

(3) 採卵

雌の場合は、薄黄色の粒の塊が断続的に落ちてくるので、放卵が終わるまで静置する。卵は沈殿するので、上澄みの海水を除去して濃縮することができる。得られた卵を鏡し、受精膜が張っておらず、真球型で大きさが揃っており、異常なものがほとんど見られなければ試験に使用する。キタムラサキウニの正常な成熟卵は、直径90 μm、橙色、真球型であり、受精すると厚く透明な受精膜が速やかに出来るので未受精卵と受精

卵の識別は容易である。保存の際は多量の海水とともに容器に入れ冷蔵する。

(4) 採精

雄の場合は、白色の筋が底に向かって伸びるように見える。精子は海水中に放出されると運動を始め、消耗により30分程度で失活してしまうため、速やかに雄を空のシャーレに移し、溜まった精液をスポイトでチューブに採取する。精液はこの状態で冷蔵すれば数日持つ。スライドガラス上に海水滴を置き、ごく微量(針の先につける程度)の精液を加えて検鏡し、運動性に問題がなければ試験に使用する。

(5) 培養溶液および容器

培養に用いる溶液は20°C程度のものを用いる。なお、ろ過海水は酸素濃度が低くなっているため、容器をよく振って(10L容器に7割入れて2分間など)酸素を溶け込ませてから使う。培養容器は底面積が大きいものを用いるか、振盪機上に置くなどの工夫をしたものを使用する。

(6) 卵の添加

各試験区の培養液に必要な量の卵を添加する。添加の際は、添加卵数の変動を小さくするため、口径の大きいピペットを用いる。加える卵が多いほど検鏡計数がしやすくなるが、採取できた卵量と培養液の総量、また卵の密度との兼ね合いから、1mlあたり50-100個程度が無難である。

(7) 添加用精子液の調製

15mlチューブ等に海水を入れ、海水に対し200分の1量の精液を添加してよく転倒攪拌し、元精子液を作る。血球計算盤を用いて元精子液の精子濃度を算出する。1個の卵に対して10,000個の精子が適正添加量なので、添加しやすい濃度になるよう元精子液を適宜希釈して添加用精子液を作る。

(8) 精子の添加

卵の入った各試験区に、必要量の添加用精子液を添加する。以後、20°C程度で培養する。

(9) 受精率の算出

精子添加から30分後に検鏡計数し、受精膜の張っている卵の割合を算出することで受精率を調べる。培養液をよく攪拌してからサンプリングする。検鏡計数時は、枠付きの1mm方眼入りスライドガラスとカウン

ターを用い、100倍以下の低倍率で検鏡すると作業がしやすい。カバーガラスをかける必要はない。1試験区につき3回以上の計数を行い、1回の計数につき100個程度の卵をカウントすることが望ましい。

(10) 観察

精子添加時を受精時とし、以降、必要に応じて観察を行う。胚の観察は受精率の算出と同様にして、1試験区につき3回以上の計数を行い、1回の計数につき100個程度の胚をカウントすることが望ましい。筆者が参加した試験では受精から24時間後を検鏡計数のタイミングとし、正常胚と異常胚の割合を算出した。この段階では後期プリズム胚まで発生が進み、正常と異常の見分けが付きやすい。なお、3時間で16細胞期から桑実胚、18時間で間充細胞胚から初期プリズム胚まで発生が進んだ。キタムラサキウニの卵割様式は等割であるため、発生初期の正常異常を見分ける際は、割球の大きさが揃っているかが指標の1つとなる。ただし、卵に対して精子が多すぎても多精受精により割球サイズがいびつになるので、コントロール区で割球サイズ異常の胚が多数観察された場合は、精子添加量が適正であったか確認すべきである。受精膜が厚く、細胞質が橙色であるのに対して無色透明であり、観察しやすいため、受精膜の形成阻害が起きた場合も確認しやすい。

(11) ルゴール・エオシン液

孵化胞胚期以降のキタムラサキウニ胚は繊毛運動で活発に遊泳するので、生きたままでは正確な計数ができない。35% MgCl₂水溶液を滴下して麻酔をかけるか、ホルマリンを滴下して固定すれば動きが止まるが、正常胚と異常胚を見分ける際はルゴール・エオシン液が便利である。ルゴール・エオシン液を数滴滴下すると異常胚のみが赤く染まり、正常胚は染まらないが動きが止まる。ただし15分程度経つと正常胚も赤く染まるので観察の直前に滴下する。以下に作り方を記す。

- A. ルゴール液：蒸留水100mlにヨウ化カリウム1.0gとヨウ素0.3gを溶かす。
 - B. 0.85%食塩水：DW 100mlにNaCl 0.85gを溶かす。
 - C. 1%エオシン液：DW 100mlにエオシンY 1.0gを溶かす。
- A~Cを混合し、褐色瓶に入れて冷暗所に保存する。

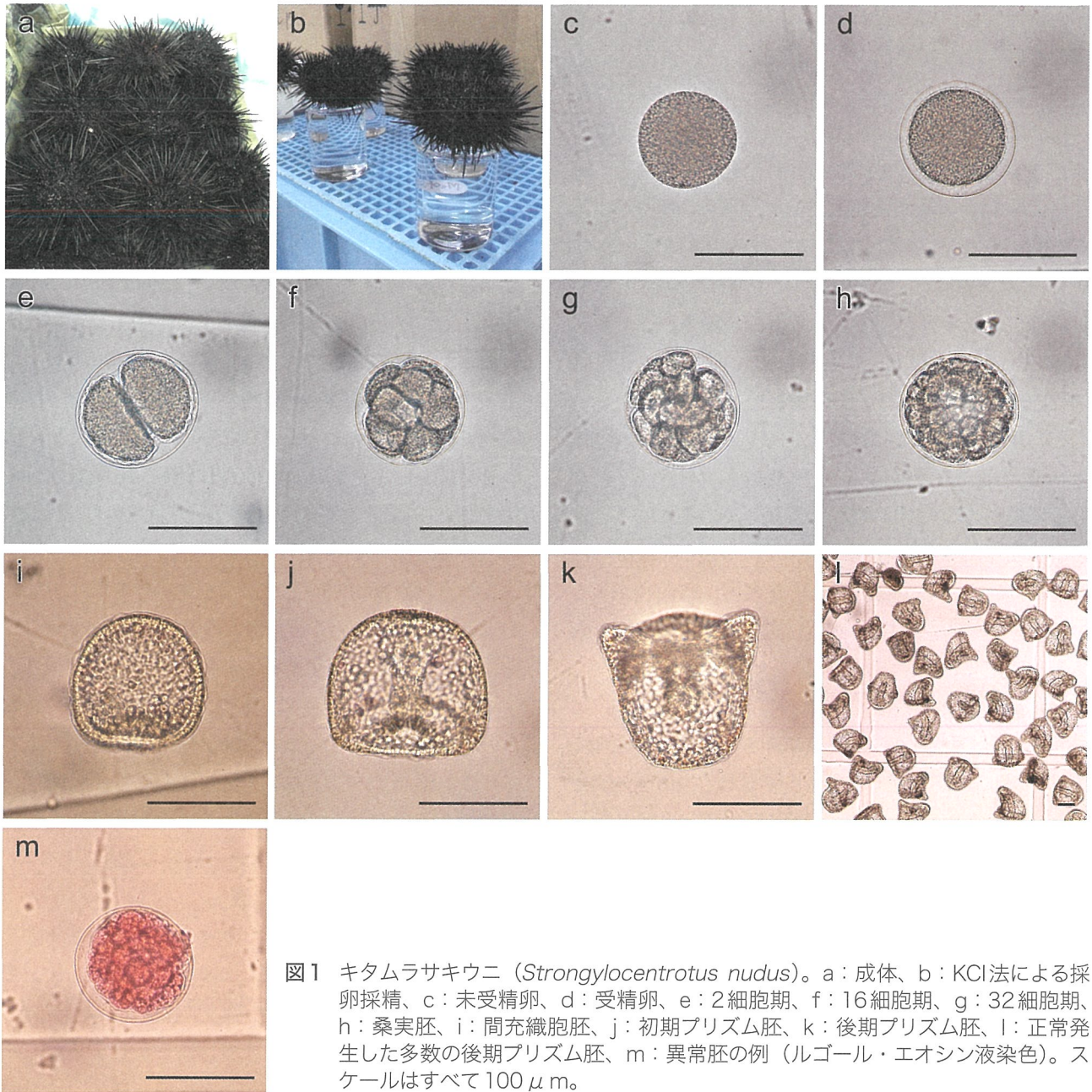


図1 キタムラサキウニ (*Strongylocentrotus nudus*)。a: 成体、b: KCl法による採卵採精、c: 未受精卵、d: 受精卵、e: 2細胞期、f: 16細胞期、g: 32細胞期、h: 桑実胚、i: 間充細胞胚、j: 初期プリズム胚、k: 後期プリズム胚、l: 正常発生した多数の後期プリズム胚、m: 異常胚の例 (ルゴール・エオシン液染色)。スケールはすべて100 μ m。

ヨウ素が揮発し黄褐色のシミができるので使用时以外は密閉すること。

3. 2 マガキ

(1) 成体の運搬および保管

購入したマガキ成体を持ち運ぶ際は、蓋付きバケツに海水を入れずにマガキを入れ、保冷剤を置いて蓋をする。キタムラサキウニよりも日持ちし、乾燥しないよう容器に蓋やラップをかけて冷蔵すれば数日間使用可能である。

(2) 殻を開く方法

マガキの雌雄および成熟度は、殻を開いて生殖巣から直接採卵、採精し、これを検鏡することで判別する。大きめの5個体を選んでマガキ塊からもぎ取り、殻表面の泥や付着生物を軽く除去する。殻の周縁部がひだ状に伸びており貝殻の合わせ目が分かりづらいので、金槌を用いて碎き削り合わせ目を露出させる。マガキの殻は平らな方と膨らんだ方があるので、平らな殻の内側に添わせるようにして合わせ目からナイフを差し込み、殻の内側をなぞるように刃を動かして貝柱を切断し、殻

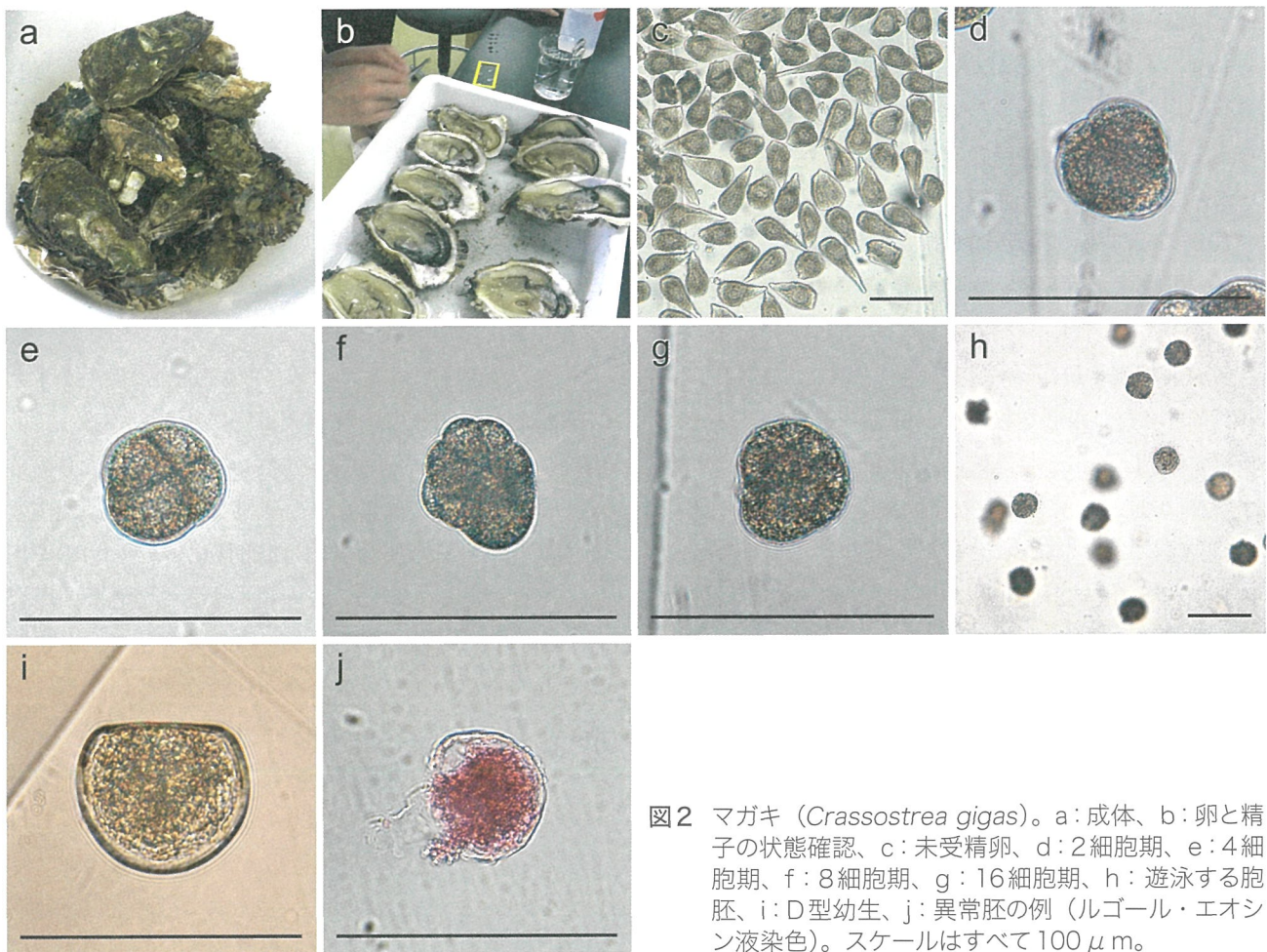


図2 マガキ (*Crassostrea gigas*)。a: 成体、b: 卵と精子の状態確認、c: 未受精卵、d: 2細胞期、e: 4細胞期、f: 8細胞期、g: 16細胞期、h: 遊泳する胞胚、i: D型幼生、j: 異常胚の例 (ルゴール・エオシン液染色)。スケールはすべて100 μm 。

を開く。殻頂側の白く膨らんでいる部分が生殖巣である。生殖巣に白いシダ状の筋が走っているものは再成熟した雌であり、多量の卵の保有が期待できる。

(3) 雌雄判別および卵、精子の状態確認

スライドグラスに海水を5滴置く。解剖鉗を用いて生殖巣に切り込みを入れ、滲み出た液をピンセットの先端に付け、これを1滴につき1個体が対応するようにスライドグラス上の海水に入れる。解剖鉗とピンセットを再使用する際は、別個体由来の卵や精子が混入しないよう、淡水で洗浄した後よく拭き取る。検鏡により雌雄を判別し卵や精子の状態を確認する。状態の良いマガキの卵は、卵巣から取り出した直後は「洋なし型」と表現される形状で、長軸70–120 μm 、短軸30–40 μm 、橙色である。尖っておらず球状をした卵は状態が良くないため使用しない。精子は運動性に問題がないものを使用する。なお、殻を開いて生殖巣に切り込みを入れた状態でも、ラップをして冷蔵すれば数日間使用で

きるため、状態の良い卵や精子を持った個体が余った場合は、実験をやり直す場合のためにストックしておくが良い。

(4) 培養溶液および容器

培養溶液と容器については、温度条件は25°C程度、他は3.1 (5) に準ずる。

(5) 採卵と採精、受精、前培養

以下では雌雄1個体ずつ用いた場合について述べる。雌の生殖巣に格子状に切り込みを入れ、ピンセットでなぞって中身をしごき出し、少量の海水で洗って茶漉しで漉しつつビーカーに受けることで採卵する。雄も同様にして採精する。卵懸濁液に精子懸濁液を混合し、海水で1Lにメスアップし、卵精子混合液を作る。この際、精子懸濁液は粘性が出すぎない程度の量にする。15分後、20 μm ネットを貼った漉し器を用いて、混合液を漉し海水で洗浄する。マガキ受精卵は直径40 μm なのでネット上に残り、発生異常の原因となる余分な

精子は洗い流される。受精卵を10L程度のプラスチック水槽に入れ、海水を加えて5L程度にし、2時間培養する。得られた卵の数が少ない時など、この培養段階の液量を少なくしたい場合は、水槽の代わりに2Lのポリ瓶を用い、海水を加えて1L程度にし、2時間の培養中15分ごとに転倒攪拌すれば、容器の底面積が小さくても底に沈んだ受精卵の酸欠を防ぎつつ培養することが可能である。

(6) 前培養の終了条件

2時間培養した胚を検鏡し、正常に発生しているか確認する。ほとんどの胚が16-32細胞期に達していれば(7)へ進む。発生が遅れていれば更に培養し、16-32細胞期に達した時点で(7)へ進む。培養開始から4時間後に16-32細胞期に達していない場合は、別の雌雄を用いて(4)からやり直す。

(7) 胚の添加、添加胚数の計数

各試験区の培養液に必要な量の胚を添加する。添加方法は3.1(6)に準ずる。この段階で一度検鏡計数を行い、培養容器内の胚の数を算出しておく。

(8) 観察

以降、必要に応じて観察を行う。観察方法は3.1(9)、(11)に準ずる。筆者の参加した試験では、試験区に胚を添加した時点から24時間後を検鏡計数のタイミングとし、正常胚と異常胚の割合を算出した。この段階ではD型幼生まで発生が進み、正常と異常の見分けが付きやすい。なお、18時間でトロコフォア幼生まで発生が進んだ。マガキの卵割様式は不等割である。マガキ卵は卵母細胞であり、精子の侵入により減数分裂が始まるため、第一極体、第二極体を放出した後に卵割が始まり、2細胞期に進む。2細胞期から32細胞期までは、大きめの割球1個の半球上にその他の小さい割球が付着した形態である。割球の配置や大きさがこの形態から外れているものを見分けることで、発生初期の正常と異常を見分けることができる。

4. 考察

4. 1 温度条件と発生速度

水質や胚の遺伝的性質以上に、培養時の温度条件が発生速度に強く影響するようである。最適な培養温度は、キタムラサキウニが20°C程度、マガキが25°C程

度であるが、この温度条件を逆にして培養すると、キタムラサキウニ、マガキ共に明らかな発生遅延が見られた。培養に適した気温の時期に試験を行うか、培養に必要な広さの空間を温度設定できるよう準備しなければならない。また、培養液は予めろ過や調製、培養容器への分注などを終え、培養を開始する前に適切な温度にしておくことに注意すべきである。

4. 2 培養容器

キタムラサキウニとマガキどちらの胚も、繊毛が生えて遊泳し始めるまでの数時間は底に沈んでいる。このため、培養容器の底面積が小さいと、胚が重なりあって下部のものが酸欠になり、異常発生あるいは死亡する危険性がある。培養容器は底面積が大きいものを用いるべきである。容器の底面積を大きくできない場合は、振盪機上に培養容器を置くなどの方法で、胚を沈殿させず常に海水とガス交換が可能にする。筆者が参加した試験では細胞培養用のセルカルチャーフラスコを用いて、大きい底面積を確保しつつ容積を減らし多数の培養容器で試験を行うことができた。しかし、特にマガキ胚では死んだ胚が底面に多数付着していたことから、セルカルチャーフラスコは底面に細胞を付着させ培養するという本来の用途上、胚が底面に付着してしまう可能性があるため、容器の選択には改善の余地がある。

4. 3 キタムラサキウニ卵巣からの直接採卵

マガキは生殖巣から直接採卵、採精するが、キタムラサキウニはKCl水溶液を用いて自然放卵、放精に近い形で卵と精子を得るため、卵や精子が成熟していても放出しない場合がある。筆者が参加した試験では、KCl法を試しても放卵、放精しなかったキタムラサキウニを生簀に入れておいたところ、数日後の夜中に集団放卵、放精が起こり、急いで採卵、採精したことがあった。これは、1個体の放卵に反応して周囲の個体が放卵、放精したものと考えられる。このことから、キタムラサキウニもマガキと同じように、生殖巣から直接採卵、採精すれば安定的に卵と精子を得られるのではないかと試してみた。しかしながら、精子は問題なさそうなものが得られ成熟卵も得られたものの、卵巣から直接採卵した卵には、直径が小さいもの、大きさは成熟卵と変わらないが中心に核のような無色透明の球体

を持つものといった未成熟卵が多数混在した。従って、キタムラサキウニの採卵では、成熟卵と未成熟卵を分離する方法もないため、成功率が不安定ではあるがKCl法を用いるべきだろう。

4. 4 雌雄何個体を用いるべきか

卵と精子は、雌雄それぞれ1個体から得られたもののみを用いると、形質が揃いやすく発生速度も均一になりやすいが、多様性の低さから全滅も起こりやすいという危険性がある。逆に、複数個体から得られた卵と精子を混合して用いると、形質は様々で発生速度もまちまちになるが、多様性が高いため安定的である。一長一短なのでどちらを採用すべきかは状況によるだろう。また、卵のみを複数個体由来にする方法、精子のみを複数個体由来にする方法もある。

4. 5 胚の正常と異常を見分けるタイミング

胚は発生が進むほど細胞数を増していき、形態はより複雑なものになるため、発生後期ほど正常胚と異常胚は見分けが付きやすい。ただし、死んだ胚の腐敗による水質の悪化、幼生の採餌、時間的なコストの関係から、無給餌であれば受精時から24時間程度が検鏡計数のタイミングとして適している。24時間程度であればキタムラサキウニは未受精卵や異常胚がそのまま残っているが、マガキは一晩でそれらが溶けてしまうので、24時間後に計数すると未受精卵や異常胚はほとんどなく、正常胚と異常胚の合計数が添加した胚の数より少なくなる。3.2 (7) で胚添加直後に検鏡計数をするのはこのためであり、ここで算出した添加胚数を母数として正常発生率を求める。

4. 6 改良点のまとめと今後の課題

本稿で記述した培養手法の改良点は、(1) 小型だが底面積の大きい容器を用いて、多数の試験区をエアレーションおよび換水なしで、厳密な濃度設定で培養可能にしたこと、(2) 定量性を重視し、略記されがちな操作手順について詳細に記述したこと、(3) 正常発生率を正しく算出するために必要となる検鏡計数の手法とタイミングを明示したことである。今後の課題としては、セルカルチャーフラスコより優れた培養容器の選定、キタムラサキウニから安定的に採卵する方法の開発が挙げられる。

5. 謝辞

合計2週間に渡って試験の場を提供していただいた宮城県水産技術総合センターと、キタムラサキウニとマガキの購入、蓄養、試験の操作その他諸々について対応して下さった同センターの押野明夫氏ならびに国立研究開発法人産業総合研究所の内藤航氏、共に試験を行った横浜国立大学の田井梨絵氏、千葉健太氏、西村悠氏に、多大なるご協力をいただきました。改めてお礼申し上げます。

参考文献

- 団勝磨・関口晃一・安藤裕・渡辺浩. 1983. 無脊椎動物の発生・上. 培風館.
 団勝磨・関口晃一・安藤裕・渡辺浩. 1988. 無脊椎動物の発生・下. 培風館.
 小林直正. 1992. 海水および化学物質のウニ卵による毒性検定. 水環境学会誌, 第15巻第10号, 643-654.
 Leverett, D. and Thain, J. 2013. Oyster embryo-larval bioassay (revised). ICES Techniques in Marine Environmental Sciences, No. 54, 1-34, ICES.